

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

AE

Excerpt translation of Japanese Patent Kokai No.216,695/83

Translation of page 1, left lower column, lines 1-7

"S P E C I F I C A T I O N

1. Title of the invention

Preparation of trehalose

2. Claim

A process for preparing trehalose, characterized in that it contains a step of treating maltose with maltose-phosphorylase to form trehalose."

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—216695

⑪ Int. Cl.³
C 12 P 19/12

識別記号

庁内整理番号
7258—4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)12月16日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ トレハロースの製造方法

⑮ 特 願 昭57—98125

⑯ 出 願 昭57(1982)6月7日

⑰ 発 明 者 星野正美

大阪府豊能郡豊能町光風台4の
9の10

⑱ 発 明 者 西野豊和

茨木市上野町15の1

⑲ 発 明 者 村尾沢夫

堺市堀上緑町2の8の12

⑳ 出 願 人 大塚食品工業株式会社

大阪市東区大手通2丁目31番地

㉑ 代 理 人 弁理士 三枝英二 外2名

明 細 書

発明の名称 トレハロースの製造方法

特許請求の範囲

(1) マルトースをマルトースホスホリラーゼ及び
トレハロースホスホリラーゼで処理してトレハ
ロースを製造することを特徴とするトレハロー
ースの製造方法。

発明の詳細な説明

本発明は、トレハロースの新規な製造方法に関
する。

トレハロースは、別名ミコースとも呼ばれ酵母、
カビ、海藻等の天然物中に広く分布する二糖類で
ある。これは他の二糖類例えばシュークロース等
に比し極めて安定なところから甘味剤、増量剤等
として又エネルギー源として広く利用されている。
従来この物質を得る方法としては、上記天然物か
ら抽出する方法又はアースロバクター

(*Arthrobacter*) 属に属する微生物 (*Aplic.*

Biol. Chem., 33, 190, 1969,

Suzuki T, Tanaka K & Kinoshita S) やノカ

ルディア (*Nocardia*) 属に属する微生物 (特開昭
50—154485) 等の微生物の醗酵による方
法が知られるが、これらの方法は、大規模生産が困
難であるか又は食品として安全に利用できるまで
精製して取得するには操作的、設備的及びエネル
ギー的に多大の投資が必要であり、現在該トレハ
ロースを安価にしかも大量に供給する技術は確立
されていない。

本発明者等は、上記従来法の欠点をすべて解消
し、安価にしかも高収率で大量に該トレハロース
を取得できる新規な方法を提供することを目的と
して鋭意研究を重ねた。その結果、安価に且つ大
量に入手できるマルトースを原料として、これに
マルトースホスホリラーゼ及びトレハロースホ
スホリラーゼを組み合せ作用させる時には、容易に
且つ高収率でトレハロースを製造できることを見

い出した。

本発明はこの新しい知見に基づいて完成されたものである。

即ち本発明はマルトースをマルトースホスホリラーゼ及びトレハロースホスホリラーゼで処理してトレハロースを製造することを特徴とするトレハロースの製造法に係る。

本発明方法によれば上記異なる二種の酵素を組み合わせ使用することに基づいて、原料とするマルトースから高収率でしかも容易に且つ効率よくトレハロースを取得することができる。本発明方法による上記マルトースからトレハロースへの転換率（即ち収率）は、実に約60%前後に及ぶものであり、これは上記各酵素につき知られている性質からは全く予期できないものである。

本発明における原料マルトースのマルトースホスホリラーゼ及びトレハロースホスホリラーゼの組み合わせによる酵素処理は、通常りん酸の存在下

また酵素処理系に存在させるりん酸としては、オルトリン酸の他りん酸ナトリウム、りん酸カリウム、りん酸二水素ナトリウム、りん酸二水素カリウム等の通常の無機りん酸及びその塩等の各種のものを使用できる。之等のうちではりん酸二水素カリウムが好ましい。上記りん酸はまた通常好ましくはりん酸塩緩衝液の形態で用いられる。従つて上記酵素処理系を構成する溶媒は、通常上記緩衝液を構成する水とされる。更に上記酵素処理系には、酵素反応に悪影響を与えない各種の溶媒例えば好ましくはイミダゾール-塩酸溶液等を添加することができる。上記りん酸の使用割合（濃度）は、特に限定的ではないが、通常原料とするマルトース1モルに対して約0.1モル以上、好ましくは約0.5~1.5モルのりん酸（又はその塩）が存在する量（濃度）とされるのがよい。酵素反応は通常約20~50℃、好ましくは約37℃付近の温度下に約24時間前後で完了する。また上

に、適当な溶媒中で行なわれる。ここで用いられる各酵素としては、公知の市販品又は之等酵素を生産する微生物の培養により得られるもののいずれでもよい。特にマルトースホスホリラーゼとしては例えばネisseria メニギチデイス

(*Neisseria meningitidis*) やラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 等の生産

する酵素が好ましい。またトレハロースホスホリラーゼとしてはユーグレナ グラチリス

(*Euglena gracilis*) 等の生産するそれが好ま

しい。之等各酵素の併用量は特に制限されず、適宜に決定される。通常原料とするマルトース1モルに対してマルトースホスホリラーゼは、0.1単位以上、好ましくは約350単位以上、またトレハロースホスホリラーゼは0.05単位以上、好ましくは約200単位以上とされるのがよい。之等各酵素量を表わす単位は、後記する方法により規定されるものである。

記酵素処理反応系のpHは、用いる各酵素がいずれも失活しない範囲、通常好ましくは約5~8、より好ましくは約6~7の範囲とされる。

上記本発明の酵素処理反応終了後、反応液はこれを加熱して酵素を失活させ、次いで遠心分離、濾過等の通常の手段により沈殿物を除去し、得られる上清を例えばドウエックス-1 (*Dowex-1*, ダウケミカル社製)、CM-セルロース (*CM-cellulose*) 等のアニオン型イオン交換樹脂で処理することにより糖液として精製することができ、かくして得られる混合液は、これを更にホウ酸型陰イオン交換樹脂に吸着させ、次いで10mM程度のホウ酸カリウム水溶液で溶出させることにより、はじめにトレハロースが溶出し、該トレハロースの溶出終了後に未反応マルトース及び副生するグルコースが順次溶出する。上記により溶出されるトレハロース画分はこれをカチオン型イオン交換樹脂に通過させ、通過液をアンモニアで中性

近までもどし、濃縮後、メタノール、エタノール等の低級アルコールを加えて蒸留して有機酸分を除去することにより、柱状のトレハロース結晶を得ることができる。

本発明方法はまた上記二種の酵素を夫々別個には予め上記適当割合となるように混合後、公知の固定化手段例えばゲル包括法、マイクロカプセル法等に従い固定化し、得られる固定化酵素（夫々別個に固定化した場合は得られる各固定化酵素適当割合に混合する）を用いて連続的に実施することもできる。この固定化酵素を用いる連続的な方法によれば、反応系に不純物の混入が非常に少なくなり、より一層高純度のトレハロースを容易に取得できるのみならず、用いる固定化酵素は反使用でき、上記トレハロースの製造がより一層率よく実施できる利点がある。上記固定化酵素を用いる方法は、これを適当なカラムに充填し、これに例えばりん酸緩衝液に溶解した原料マルト

ースを通過させることにより行われ、通過液（酵素処理された液）は、上記と同様にイオン交換樹脂を用いて精製処理される。

かくして本発明によれば、安価に且つ大量にしかも高収率でトレハロースを取得できる。

以下本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。尚各実施例に用いた各酵素は、以下の方法により調整したものである。

① マルトースホスホリラーゼの調製

ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*) IFO 3345 の培養菌体 87 g をガラスビーズ（直径 0.1 ~ 0.2 mm）を用いてセルミルで破砕後、遠心分離して上清 535 ml（酵素活性 2600 単位）を回収した。次にこの上清 515 ml に、2% プロタミン硫酸 80 ml を加え、12℃で30分間攪拌後、遠心分離し、上清 580 ml（酵素活性 2395 単位）を回収した。これに硫酸アンモニウム 140 g を加え（40% 飽和）、2

遠心分離により集め、5 mM クエン酸緩衝液（pH 6.6）に溶解し、粗酵素標品 20 ml を得た。酵素活性は 1638 単位であつた。

上記マルトースホスホリラーゼにおける単位は、以下により求められたものである。即ち 0.2 モル濃度の K_2HPO_4 -クエン酸緩衝液（pH 5.2）の 0.2 ml に酵素溶液 0.6 ml を加え 37℃ 中に 5 分間置いて予熱する。この時対照として酵素液のかわりに水を用いたものを同時に用意し、以下同様に行う。次に 0.2 ml の 0.2 M 濃度のマルトースを加え、37℃ にて 10 分間反応させる。次に沸騰した湯浴中に没して反応を停止させる。次にこの反応液中に生じたグルコースの量をグルコースオキシダーゼ法により定量する。この条件下で 1 分間に 1 μmol (180 μg) のグルコースを生成する酵素量を 1 単位とした。

② トレハロースホスホリラーゼの調製

ユーグレナ グラチリス (*Euglena gracilis*

で 30 分間攪拌したのち、遠心分離して沈殿を去し、さらに硫酸アンモニウム 170 g を加え（80% 飽和）、2℃ で 12 時間放置し、生じた沈殿を遠心分離にて取得した。沈殿を 100 ml の 5 mM クエン酸緩衝液（pH 6.6）に溶解し、原液と同緩衝液で 2℃ 冷却下に 20 時間透析を行った。これを 5 mM クエン酸緩衝液（pH 6.6）で平衡化させた DEAE-セルロースカラム（直径 4 × 27 cm）に通し、吸着させた。5 mM クエン酸緩衝液（pH 6.6）で洗った後、0 ~ 1 M CsCl（クエン酸緩衝液、pH 6.6）のリニアグラディエントで蛋白を溶出させた。20 ml ずつ分画を行ない、活性画分を集めて、再び 5 mM クエン酸緩衝液（pH 6.6）に対し 20 時間の透析を行ない、同様に DEAE-セルロースによるイムノクロマトグラフィーを行った。この操作で得られた酵素溶液に 80% 飽和となるよう硫酸アンモニウムを加え、4℃ で一晩放置した。沈殿は

var. bacillaris) の培養菌体 500 g (湿潤重量) を 2 mM-EDTA-4 mM-りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) - 2.5% グリセロール 600 ml に懸濁した。これを 200 ml ずつ氷水中で冷却しながら超音波処理し菌体を破砕し、8000 rpm の遠心分離により上清を得、更に沈殿を洗浄し、上記上清と洗浄液とを合せ粗酵素抽出液 1610 ml を得た。この液をプロタミン処理し、沈殿した酵素を集め、上記と同一の緩衝液に再懸濁させて粗酵素標品 300 ml を得た。その酵素活性は 86 単位であつた。

上記トレハロースホスホリラーゼにおける単位は、以下により求められたものである。即ち 20 ml の蒸質液 (100 mM イミダゾール-HCl 緩衝液 (pH 7.0)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、100 mM トレハロース) に 20 μ g の酵素液を加え、37℃にて10分間反応させた後、0.5 ml のソモジ (Somogyi) 試薬を加え

上清液を得た。この上清液のトレハロース濃度は 5.9 mg/ml であつた。

次いで該上清液に水を加え 100 ml とし、充分水洗した Dowex 1 (OH⁻型、 ϕ 2×23 約 72 ml、ダウケミカル社製) のカラムにかけ、次に約 140 ml の水を流し、通過液と洗液を合わせた。この液に四ホウ酸カリウムを加えその濃度が 1 mM となる様に調整した。この溶液を Dowex 1 (ホウ酸型、 ϕ 2×33、約 103 ml、ダウケミカル社製) のカラムにかけトレハロースを吸着させた後、10 mM 四ホウ酸カリウムで溶出した。溶出液は 18 ml づつ分画した。トレハロースは 63~72 の分画画分で得られた。この 63~72 の画分を集め Dowex 50W (H⁺型、 ϕ 2×33、約 103 ml、ダウケミカル社製) のカラムにかけ、約 200 ml の水で洗浄し先の通過液と合わせた。アンモニアで pH を中性にもどしロータリーエバポレーターで濃縮した。メタノールを加え蒸留を繰り返してホウ

沸騰する湯浴中で15分間加熱する。次に冷却後ネルソン (Nelson) 試薬 0.5 ml を加え室温で 20 分間放置する。次に水を 4 ml 加えて、500 mM で比色し、反応系に生じたグルコースの量を求める。この条件下で1分間に1 μ モルのグルコースを生成する酵素量を1単位とした。

実施例 1

下記組成の混合液を調製した。

マルトースホスホリラーゼ 0.2 単位 / ml

トレハロースホスホリラーゼ 0.158 単位 / ml

りん酸二水素カリウム-クエン酸緩衝液 40 mM (pH 7.0)

イミダゾール・塩酸緩衝液 40 mM (pH 7.0)

この混合液 50 ml にマルトース 5 g を加え 37℃で 24 時間攪拌した。その結果トレハロース 2.95 g が生成し、未反応マルトースは 1.0 g であつた。次いでこれを 100℃にて10分間加熱し反応を停止させ、遠心分離により沈殿を除去し、

酸を除去した後、シロツブ状になるまで減圧濃縮しエタノール 48 ml を加え沈殿を得た。溶液を 50℃に加熱するとともに少量の水を加え沈殿を溶解させた。その後 4℃で放置し、2 日後生じた結晶を回収し少量の冷エタノールで洗浄して減圧下乾燥剤 (シリカゲル+五酸化リン) で1晩乾燥させ、柱状のトレハロースの結晶約 2.4 g を得た。

かくして得られた結晶 (以下④とする) についてシグマ (Sigma) 社製、市販高級試薬トレハロース (以下⑤とする) を対照に各種確認試験 (1~5.) を行つたところ、以下の通り本実施例で得られた結晶は高純度のトレハロースであることが確認された。

確認試験 1 融点

④: $m.p. = 133 \sim 134^{\circ}\text{C}$

④と⑤の混融試験でも同値を示した。

確認試験 2 旋光度

④: $(\alpha)_D^{25} = +176.4^{\circ}$ (C 1 水)

特開昭58-216695(5)

内部標準：1=シュークロース、2=トレハロース

確認試験5 純度

④の結晶の還元力をソムジーネルソン(Somogyi-Nelson)法で測定した結果、還元力のないことが認められた。また0.1M酢酸緩衝液(pH5.6)0.5mlに④の水溶液4mlを加え、さらに100μg/mlのトレハラゼ水溶液0.1mlを加え37℃で30分間反応させ生じたグルコースをグルコースオキシダーゼ溶液(グルコースオキシダーゼ30μg及びパーオキシダーゼ3μgを50mMリン酸緩衝液(pH7.0)90mlに溶解させ、ジアニジンジエタノール溶液1mlを加え、同緩衝液で100mlに調整したもの)で定量しトレハロース量を求めたところ④の102%の純度を示した。

実施例 2

次の組成から成る混合液50mlにマルトース800μgを加え、37℃で24時間攪拌したところ、トレハロース475μg及びマルトース17.5

⑤： $(\alpha)_D^{21} = +176.1^\circ$

確認試験3 IR

④と⑤のIRを比較したところ2400-2100 cm^{-1} で若干相違が認められるが他は完全に一致した。④のIR図を第1図に、また⑤のIR図を第2図に示す。

確認試験4 ガスクロマトグラフィー

④と⑤のガスクロマトグラフィーを比較したところ完全に一致した。④の純度は⑤に比べて118%となつた。ガスクロマトグラフィー分析図を第3図に示す。図中(1)は④を、(2)は⑤を、(3)は④と⑤との50:50の混合物を示す。

第3図における測定条件は次の通りである。

カラム：金属カラム(1m)

固定相：5%SE-30/Chromosorb

カラム温度：160→250℃、5℃/minで昇温

入口温度及び検出温度：285℃

流速：30ml/min

μgが得られた。これを実施例1と同様にしてトレハロースの結晶400μgを得た。

マルトースホスホリラーゼ 0.2単位/ml

トレハロースホスホリラーゼ 0.1148単位/ml

リン酸-クエン酸緩衝液 40mM(pH6.3)

イミダゾール-塩酸溶液 40mM(pH6.3)

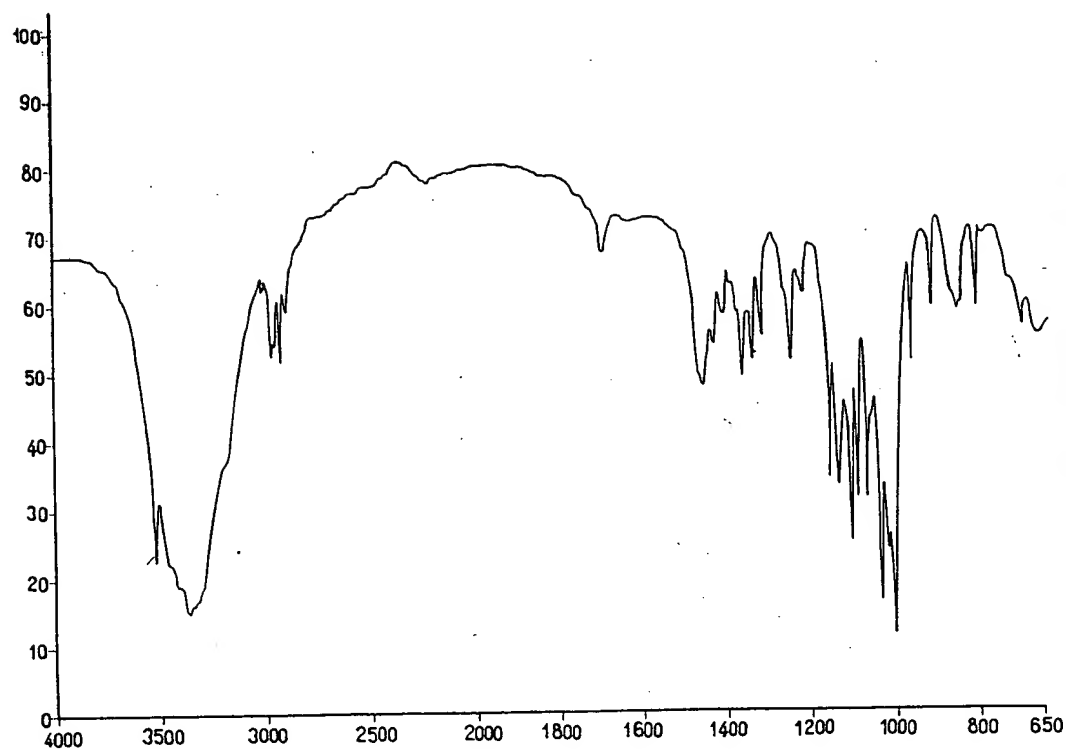
図面の簡単な説明

第1図は本発明で得られるトレハロースの赤外線吸収スペクトル分析図、第2図は市販トレハロースの同分析図及び第3図は上記各トレハロースのガスクロマトグラフィー分析図である。

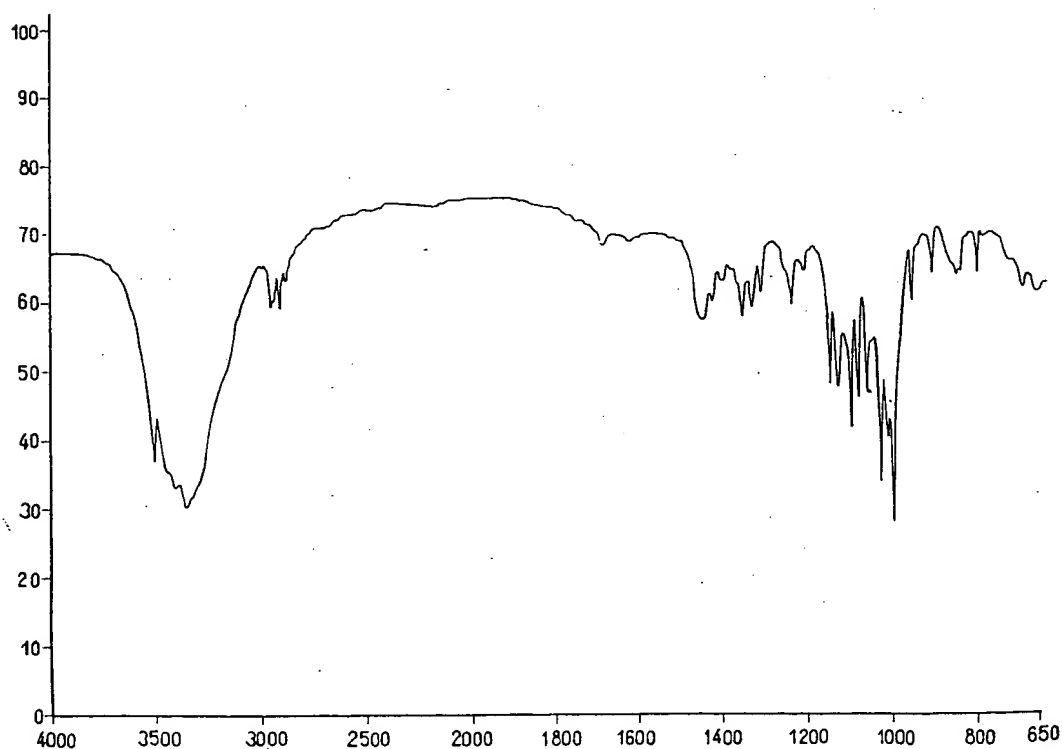
(以上)

代理人 弁理士 三 枝 英 二

第 1 図



第 2 図



第 3 図

